

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年5月19日(19.05.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/044837 A1

(51) 国际分类号⁷: C07J 53/00, C08G 65/48, A61K 31/56,
A61P 9/00

中国北京市海淀区花园路13号道隆商务会馆 Beijing
100088 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/001259

(22) 国际申请日: 2004年11月5日(05.11.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200310103179.5 2003年11月7日(07.11.2003) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 北京键凯科技有限公司(BEIJING JENKEM TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区上地信息路2号国际科技创业园C栋四层, Beijing 100085 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 朱德权(ZHU, Dequan) [CN/CN]; 中国北京市清华大学华业大厦2611房间, Beijing 100084 (CN)。嵇世山(JI, Shishan) [CN/CN]; 中国北京市清华大学华业大厦1206房间, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京同立钧成知识产权代理有限公司
(LEADER PATENT & TRADEMARK FIRM)

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT 公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: THE CONJUGATES OF A HYDROPHILIC POLYMER-BUXUS'S EXTRACTS AND THE PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS OF THEREOF

(54) 发明名称: 亲水性聚合物-黄杨木提取物的结合物及其药物组合物

(57) Abstract: The conjugates of a hydrophilic polymer-Buxus's extracts or its derivatives were prepared by modifying Buxus's extracts such as cyclovirobuxine D and the like with said hydrophilic polymer such as polyglycol. With these conjugates, the produced drugs have improved water-solubility and prolonged half-lives in vivo.

(57) 摘要

一种亲水性聚合物-黄杨木提取物或其衍生物的结合物, 该结合物是将黄杨木提取物如环常绿黄杨碱 D 等通过如聚乙二醇的所述亲水性聚合物修饰后, 以达到提高该类药物的水溶性和延长其在生物体中的循环半衰期。

亲水性聚合物—黄杨木提取物的结合物及其药物组合物

发明领域

本发明涉及亲水性聚合物与黄杨木提取物的结合物以及包含该结合物的药物组合物。

背景技术

黄杨木提取物一般是指黄杨木生物碱如环常绿黄杨碱 D (Cyclovirobuxine D, 又称黄杨宁)、环原黄杨碱 A (Cycloprotobuxine A)、环原黄杨碱 C (Cycloprotobuxine C)、环常绿黄杨碱 C (Cyclovirobuxine C) 等小分子的活性物质。

黄杨木是黄杨科植物小叶黄杨，产于江南。《本草纲目》记载，主治行气活血，祛湿通络等。作为中药，多用于风湿性心脏病的治疗。经提取分离，其有效成分生物碱环常绿黄杨碱 D 制成的片剂，临幊上用于冠心病治疗取得了较满意的效果。

环常绿黄杨碱 D 具有降低心肌耗氧量，增强心肌收缩力，增加冠状动脉血流量，防止心律失常，缓解心绞痛等疗效，临幊效果甚佳。但是它溶解性较差，目前只限于口服片剂，注射用针剂由于加有酸性成分助溶，生物体体液中容易析出结晶，造成不必要的问题，诸如毒性较大，血性不良等特征。并且其在生物体中的半衰期较短，持续时间不长，口服制剂需要一日多次才能保证疗效。为了提高药物的药理学半衰期，增强其稳定性及到达靶部位的几率，提高水溶性，改变给药途径和改善生物利用度，和水溶性高分子聚合物键合成为本发明的研究重点。

目前，聚乙二醇衍生物广泛地用在与蛋白质、肽以及其他治疗药物的结合以延长药物的生理半衰期，降低其免疫原性和毒性。在临幊使用中，PEG 及其衍生物作为制作药物制剂的载体已经在很多商业药品中得到了广泛的应用，而将 PEG 键合到药物分子的尝试在最近十年里也得到了长足的发展，在许多批准药品中被广泛使用，如 PEG-intron®，一种 α -干扰素与聚乙二醇的键合物就表现出了更长的循环半衰期和更好的治疗效果。紫杉醇与聚乙二醇的键合物也相应的降低了毒性和延长了生物活性。它们在人体内的代谢过程已相当清楚，是一种安全的、无副作用的药物改性剂。

在与药物结合时，常用到一种被称为聚乙二醇化 (PEGylation) 的工艺，即聚乙二醇两端的一个或二个端基被化学活化后具有一适当的官能团，此官能团对要结合的药物中的至少一个官能团具有活性，能与之形成稳定的键。

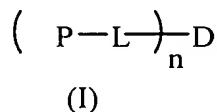
因此，本发明的目的是通过类似的方法用亲水性聚合物与黄杨木提取物结合，由

此提高黄杨木活性提取物的溶解性能，延长黄杨木活性提取物在生物体中的循环半衰期，以保证适当的药物浓度和提供缓释功能。

发明概述

本发明提供了亲水性聚合物与黄杨木提取物或其衍生物的结合物。其中，所述黄杨木提取物例如是环常绿黄杨碱 D、环原黄杨碱 A、环原黄杨碱 C、环常绿黄杨碱 C 等；所述的亲水性聚合物选自由聚乙二醇、聚谷氨酸、聚天门冬氨酸、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚丙烯吗啉以及它们的共聚物所组成的组。

按照本发明的一个方面，所提供的亲水性聚合物—黄杨木提取物或其衍生物结合物具有以下通式：



其中：

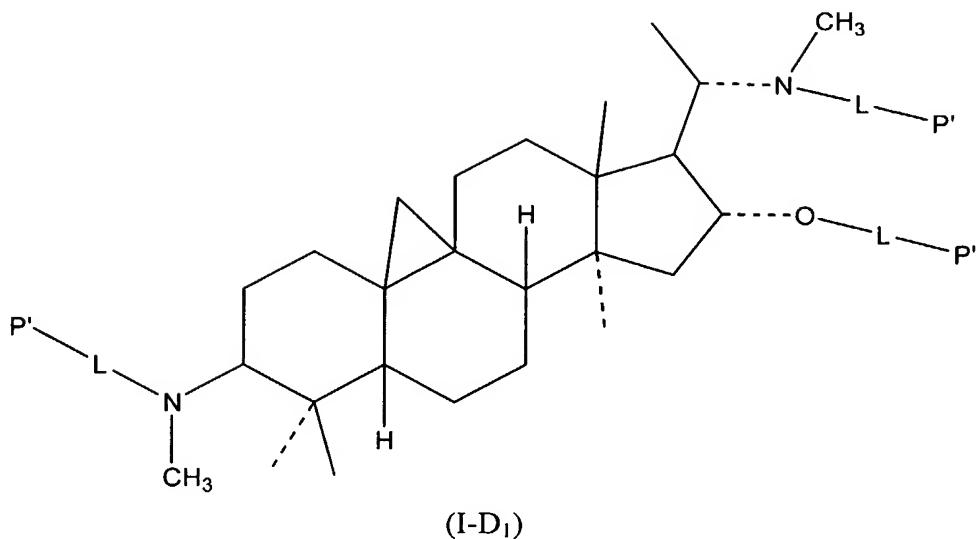
P 为亲水性聚合物，所述的亲水性聚合物选自由聚乙二醇、聚谷氨酸、聚天门冬氨酸、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚丙烯吗啉以及它们的共聚物所组成的组；

n 是一整数，最大不超过 D 上的羟基和氨基总数；

L 为连接基团，所述的连接基团 L 选自由酯基、碳酸酯基、酰胺基、酰胺酯基、醚基、氨基甲酸酯基和乙缩醛所组成的组；以及

D 为黄杨木提取物或其衍生物，所述黄杨木提取物或其衍生物选自由环常绿黄杨碱 D、环原黄杨碱 A、环原黄杨碱 C、环常绿黄杨碱 C 和其衍生物所组成的组。

优选地，本发明还提供以通式(I-D₁)表示的亲水性聚合物—环常绿黄杨碱 D 结合物：

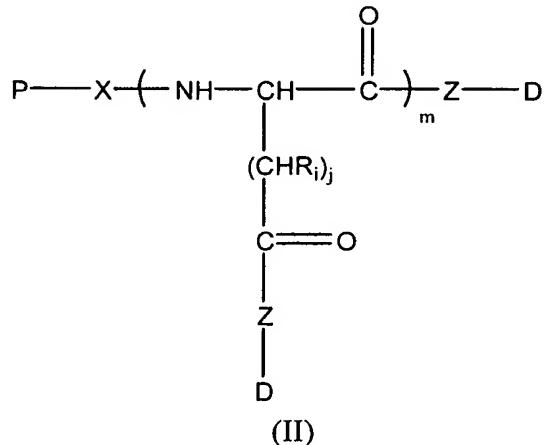


其中：

P' 代表 H 或亲水性聚合物 P, 但不同时为 H; 以及

L 为如前所述的连接基团。

按照本发明的另一个方面, 提供了以通式(II)表示的亲水性聚合物—多羧基寡肽—黄杨木提取物或其衍生物结合物:



其中：

P 是亲水性聚合物, 所述的亲水性聚合物选自由聚乙二醇、聚谷氨酸、聚天门冬氨酸、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚丙烯吗啉以及它们的共聚物所组成的组;

m 是 2—12 的整数;

j 为 1—6 的整数；

R_i为选自于以下组中的基团：H、C₁₋₁₂烷基、取代芳基、芳烷基、杂烷基、和取代烷基；

X 是连接基团，所述的连接基团 X 是 $(CH_2)_k$ 、 $(CH_2)_kOCO$ 、 $(CH_2)_kNHCO$ 、或 $(CH_2)_kCO$ ，而 k 是 0—10 的整数；

Z 是连接基团，所述的连接基团 Z 是 O、NH、NHR、O(CH₂)_hCOO、或 NH(CHR)_hCOO，而 h 是 1—10 的整数；

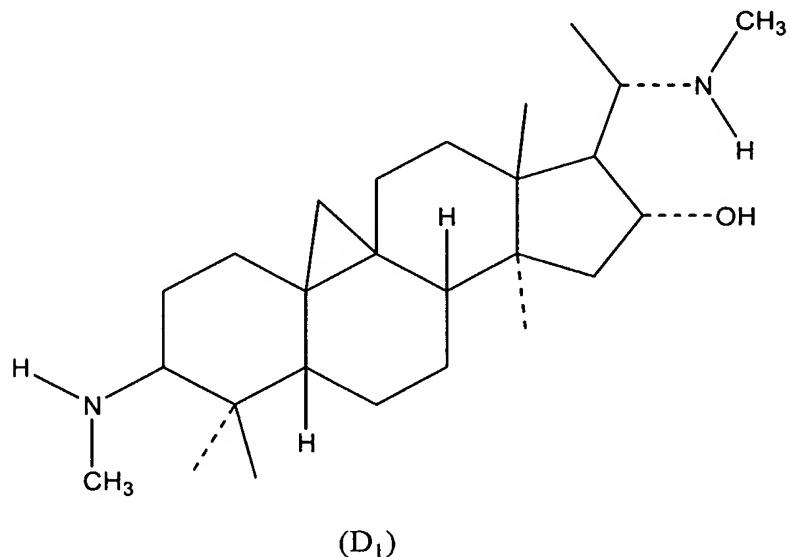
D 为前述的黄杨木提取物或其衍生物，优选为环常绿黄杨碱 D。

按照本发明的再一个方面，提供了包含上述结合物的药物组合物。

本发明的一个优点是通过亲水性聚合物的改性可对结合药物提供保护，提高结合物的稳定性和水溶性，延长在生物体内的活性周期。

具体实施方式

黄杨木活性提取物是一类甾体生物碱。其主要来源是黄杨木的植株，其主要成分环常绿黄杨碱 D 的化学结构如下式(D₁)所示：

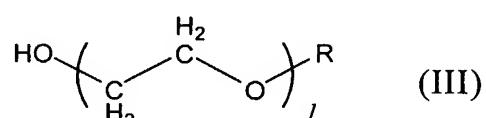


本发明的结合物按如下方法制备的：对亲水性聚合物进行改性，引入活性官能团，

然后再与黄杨木碱活性提取物如环常绿黄杨碱 D、环原黄杨碱 A、环原黄杨碱 C、环常绿黄杨碱 C 上的羟基或氨基结合。可通过适当的方式选择性的和生物碱中的羟基结合，从而保证了黄杨木碱活性提取物的生物碱特性。

现在以聚乙二醇作为亲水性聚合物的例子进行说明。但应理解的是，本发明的亲水性聚合物也包括水溶性聚合物，并且不仅限于聚乙二醇或其共聚物，还可使用例如聚谷氨酸、聚天门冬氨酸、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚丙烯吗啉以及它们的共聚物。

聚乙二醇（PEG）的结构式可如 I 所示：



其中：

R 为 H 或 C₁₋₁₂ 烷基，l 为任何整数，表征其聚合度。

当 R 为低级烷基时，R 可以是含有 1—6 个碳原子的任何低级烷基，如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、正戊基或正己基。当 R 为环烷基时，R 优选为含 3—7 个碳原子的环烷基，如环丙基、环丁基和环己基。优选的环烷基为环己基。R 最优选为甲基，即所形成的化合物是甲氧基聚乙二醇（mPEG）。

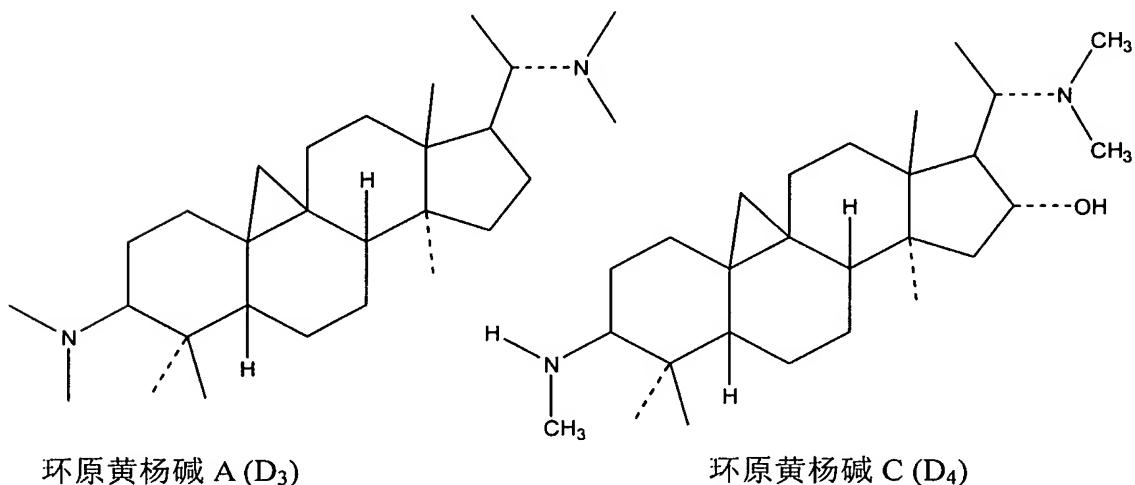
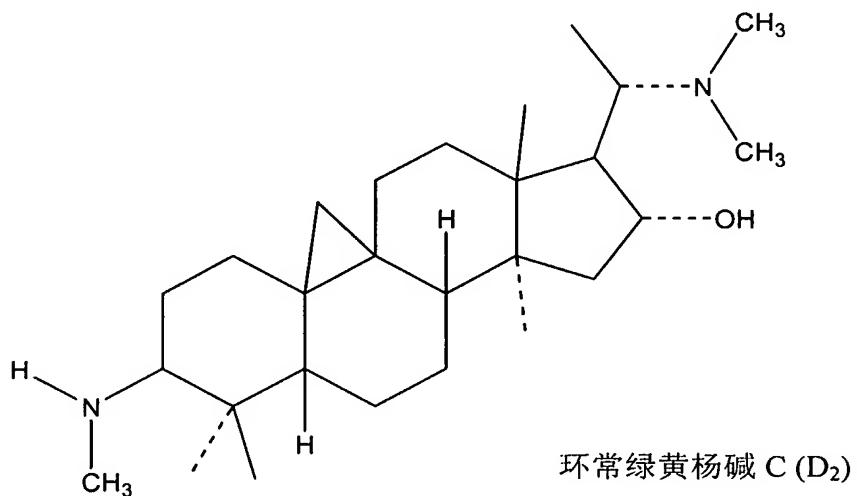
对聚乙二醇而言，一般采用分子量予以表示，只要使形成结合物的聚乙二醇的分子量为 300~60,000 道尔顿，这相当于 l 为大约 6~1300。更优选为，l 为 28、112 和 450，这分别相应于分子量为 1325、5000 和 20,000。由于通常由其平均分子量而非自重复单元限定的起始 PEG 化合物的潜在不均一性，优选用分子量表征聚乙二醇聚合物，而不是用整数 l 表示 PEG 聚合物中的自重复单元。各种分子量的起始 PEG 化合物可以通过本领域中的已知方法制备或者可以从商业来源得到。

当然，除了直链聚合物分子，支链或其他结构的聚合物也可以用于对黄杨木碱提取物的分子结构改造，比如 Y 形分支、U 形分支等等。可以根据对具体的药物分子的性能适当要求选择合适的组合结构。

如果采用各种氨基酸作为反应原料，将同样获得含有羧基的端基官能团。特别的，如果使用酸性氨基酸或者含酸性氨基酸的聚合物，将获得含有多个活性羧基的端基官能团。此种结构将有利于提高对小分子的各种天然药物成分的负载率，并可通过分步降解获得缓释效果。

如本发明中所特别提到的多羧基寡肽，该寡肽由谷氨酸、天门冬氨酸等酸性氨基酸聚合而成，并对聚乙二醇等亲水性聚合物修饰后得到的亲水性聚合物—多羧基寡肽结构，此结构和一些非亲水性的药物结合后，将明显改善该药物的药代动力学特征，大幅度提高其溶解性，并具有亲水性聚合物所带来的优良特性。很重要的一点，这种结合物可在体液中逐步降解释放出活性成分，从而达到该药物的治疗效果。

在本发明中，黄杨木活性提取物主要是用常规方法通过提取植株茎叶果实而得到的，其主要包括环常绿黄杨碱 D (Cyclovirobuxine D, 又称黄杨宁)、环原黄杨碱 A (Cycloprotobuxine A)、环原黄杨碱 C (Cycloprotobuxine C)、环常绿黄杨碱 C (Cyclovirobuxine C)，除环常绿黄杨碱 D 外，另三种提取物的化学结构如下所示：



这些结构中都包含有多个羟基和氨基，可以通过酯基、碳酸酯基、酰胺酯基等方式与已经过端基改性的聚合物结合，以达到对药物分子的有效保护和合理利用。特别

的，酯基在生物体中可以通过生物降解的方式释放出药物活性成分。在临床应用中主要采用口服片剂使用，起效慢，每日服药次数频繁。目前采用的改进办法是使用酸碱调节剂以制备针剂，在实际使用中发现在体液中（如血液，血浆中）有显著的沉淀现象，因此导致大部分被免疫系统吞噬，不能起到治疗作用。通过本方法改进后的药物制剂水溶性良好，起效快，持续时间长，能够有效的起到急救治疗的作用。

本发明的结合物可以纯化合物形式或适宜的药物组合物进行给药，可采用任何可接受的给药方式或用于类似用途的试剂进行。因此，本发明的另一个方面是提供包含所述结合物的药物组合物。

采用的给药方式可选择通过口、鼻内、直肠、透皮或注射给药方式，其形式为固体、半固体、冻干粉或液体药剂形式给药，例如，片剂、栓剂、丸剂、软和硬明胶胶囊剂、散剂、溶液剂、混悬剂或气雾剂等，优选采用适用于精确剂量的简单给药的单元剂量形式。组合物可包含常规药用载体或赋形剂和作为活性成分（一种或多种）的本发明的结合物，此外，还可包含其它药剂、载体、辅剂等。

通常，根据所需给药方式，药学上可接受的组合物将包含约 1 至约 99 重量% 的本发明结合物、以及 99 至 1 重量% 的适宜的药用赋形剂。优选组合物包含约 5 至 75 重量% 的本发明结合物，其余为适宜的药用赋形剂。

优选的给药途径是注射给药，采用常规剂量方案，该方案可根据疾病的严重程度进行调整。本发明的结合物或其药学上可接受的盐也可配制成注射用剂，例如使用约 0.5 至约 50% 的活性成分分散于可采用液体形式给药的药用辅剂中，实例为水、盐水、含水葡萄糖、甘油、乙醇等，从而形成溶液剂或混悬剂。

可采用液体形式给药的药物组合物例如可通过溶解、分散等手段将本发明的结合物（约 0.5 至约 20%）和选择性存在的药用辅剂溶解、分散于载体中，载体的实例为水、盐水、含水葡萄糖、甘油、乙醇等，从而形成溶液剂或混悬剂。

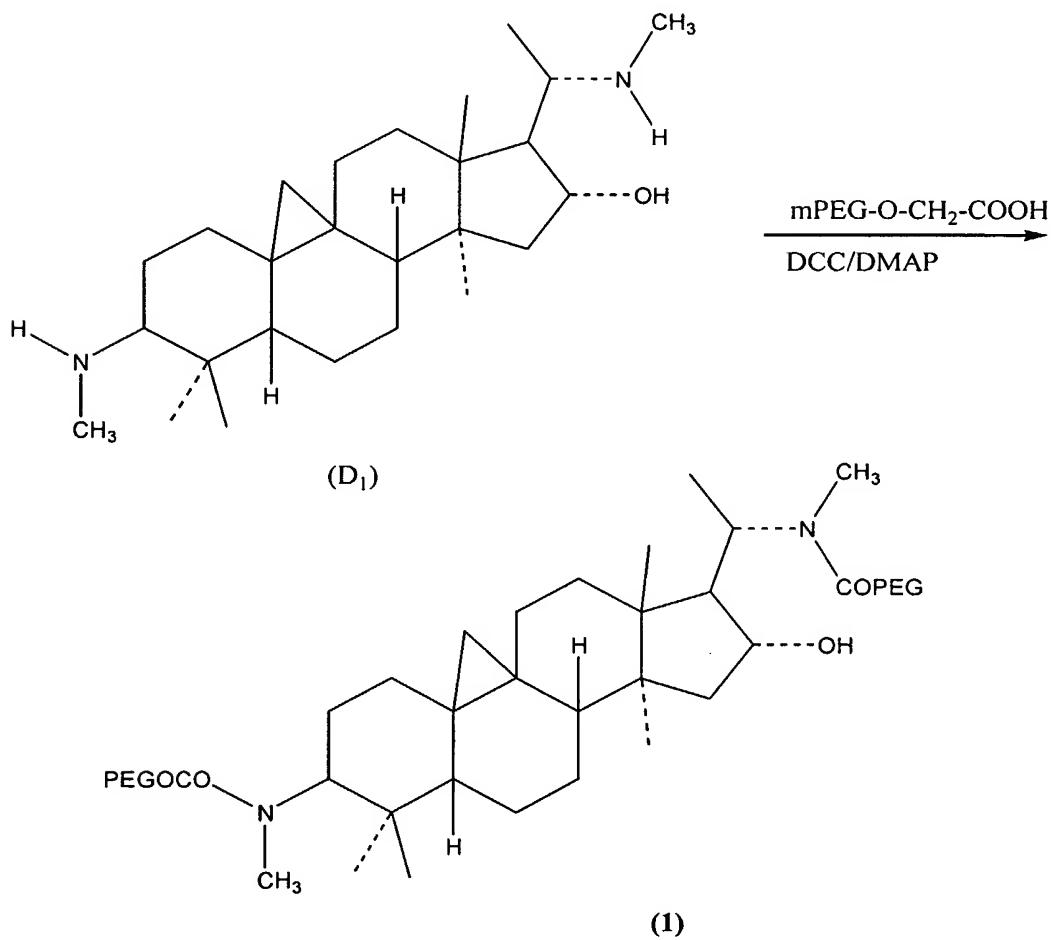
如果需要的话，本发明的药物组合物还可包含少量的辅助物质，如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂、抗氧化剂等，例如：柠檬酸、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、丁基化羟基甲苯等。

该类剂型的实际制备方法是本领域的技术人员公知的或者显而易见的，例如可参见 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版, (Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1990)。无论如何，按照本发明的技术，所使用的组合物将含有治疗有效量的本发明结合物，以用于治疗相应的疾病。

实施例

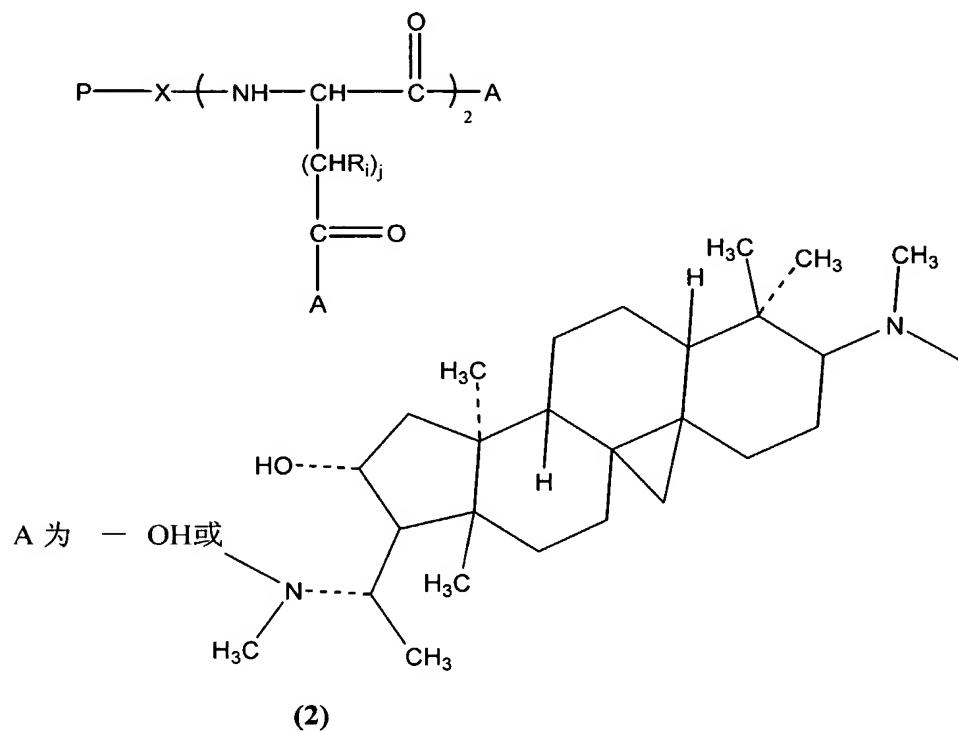
下面结合实例描述本发明的结合物及其制备方法，它不限制本发明，本发明的范围由权利要求限定。

实施例 1
酰胺基键合的聚乙二醇乙酸和环常绿黄杨碱 D 的合成



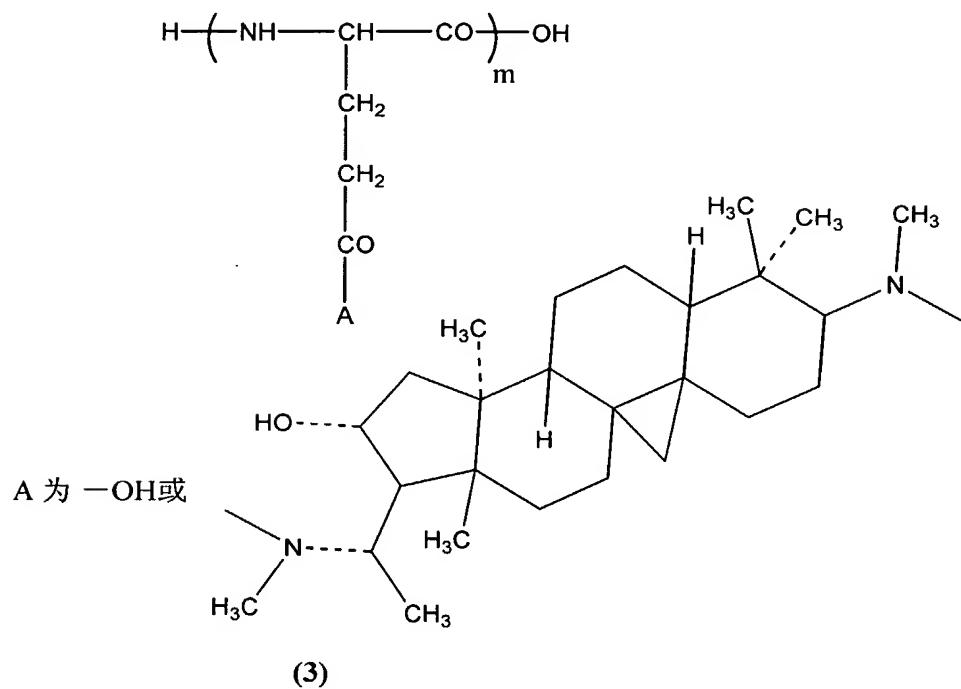
5 克甲氧基聚乙二醇乙酸 (mPEG-O-CH₂-COOH, Mw5000), 0.25 克环常绿黄杨碱 D (D₁), 0.2 克 4-二甲基氨基吡啶 (DMAP) 溶于 50 毫升无水二氯甲烷, 添加 0.32 克二环己基碳二亚胺 (DCC)。氮气保护下过夜搅拌, 多余溶剂通过旋转蒸发除去, 残余物添加 20 毫升 1,4-二氧六环。过滤除去沉淀, 滤液部分通过旋转蒸发浓缩。残余物添加 100 毫升异丙醇, 产物过滤收集, 真空干燥。得到 N,N'-二甲氧基聚乙二醇乙酸-环常绿黄杨碱 D 酰胺 (1), 产率: 4.2 克 (83%), 熔点: 57—59°C。

实施例 2
酰胺基键合的聚乙二醇多羧基寡肽和环常绿黄杨碱 D 的合成



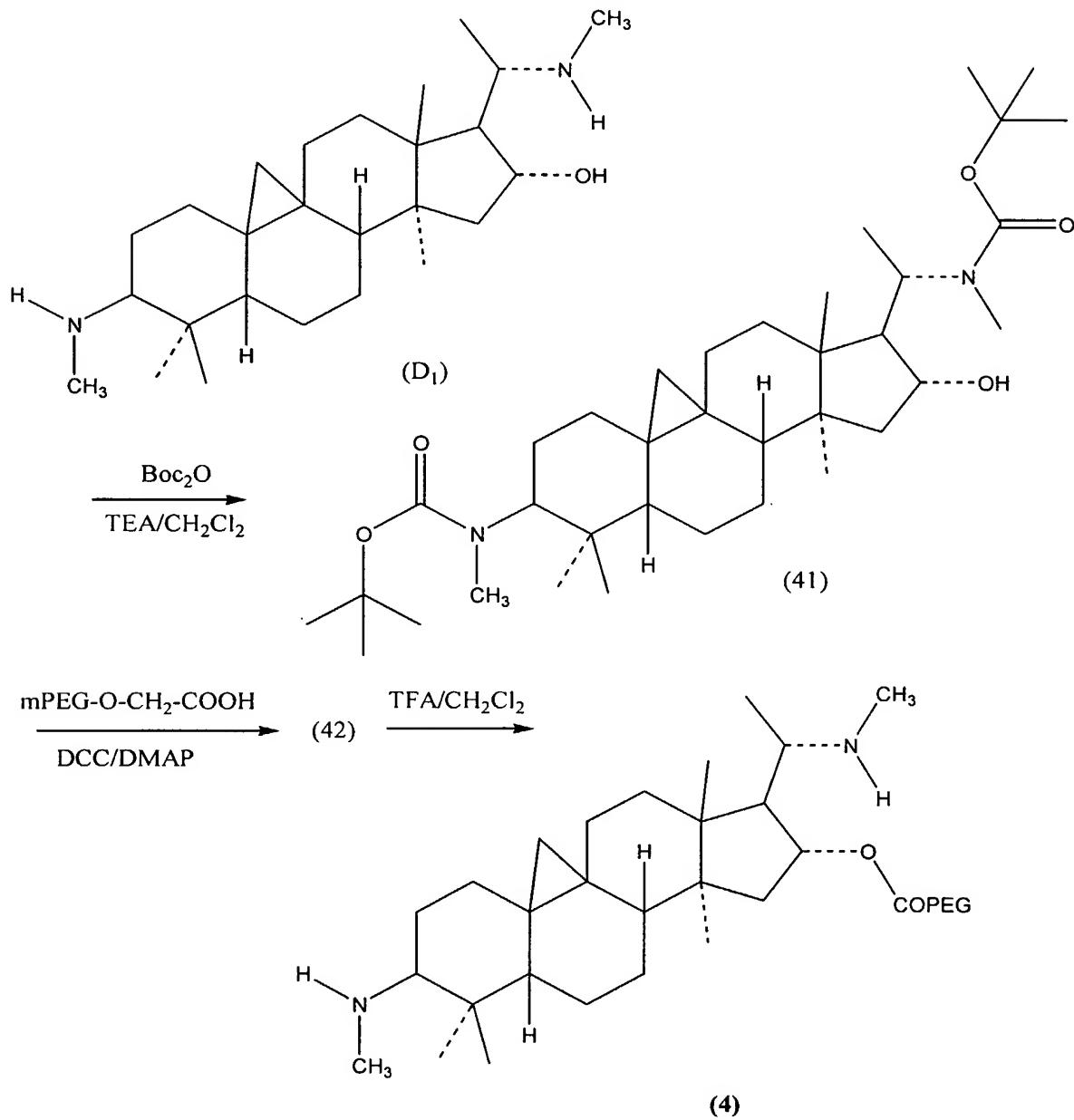
方法同实施例 1，将甲氧基聚乙二醇乙酸换为甲氧基聚乙二醇-谷氨酸二肽 (Mw10500)。得到甲氧基聚乙二醇谷氨酸二肽-环常绿黄杨碱 D 酰胺 (2)，产率：0.9 克 (90%)，熔点：58-59°C。

实施例 3
酰胺基键合的聚谷氨酸和环常绿黄杨碱 D 的合成



方法同实施例 1，将甲氧基聚乙二醇乙酸换为聚谷氨酸(Mw5000)。得到聚谷氨酸-环常绿黄杨碱 D 酰胺 (3)，产率：0.9 克 (90%)。

实施例 4
酯基键合的聚乙二醇乙酸和环常绿黄杨碱 D 的合成



1.0 克环常绿黄杨碱 D, 0.8 毫升三乙胺 (TEA) 溶于 10 毫升二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 的溶液中, 冰水浴滴加入含 1.2 克二碳酸二叔丁基酯 (Boc_2O) 的二氯甲烷溶液 10 毫升, 10 分钟滴完后室温反应 3 小时, 减压浓缩, 加入 20 毫升异丙醇, 冷冻析出沉淀, 沉淀过滤, 异丙醇洗涤 2 次, 真空干燥, 得产物 N,N'-二叔丁氧酰-环常绿黄杨碱 D(41)。产率: 1.06 克, NMR (DMSO): 0.37(s,1 个氢), 0.52(s,1 个氢), 0.79(t,6 个氢), 1.38(s,18 个氢), 7.11(s,1 个氢)。熔点: 125-129°C。

0.5 克甲氧基聚乙二醇乙酸 (Mw10000), 80 毫克 N, N'-二叔丁氧酰-环常绿黄杨碱 D (41) (由上步制得, Mw1250), 18 毫克 4-二甲基氨基吡啶溶于 15 毫升无水二氯甲烷中, 再添加 30 毫克二环己基碳二亚胺。溶液室温过夜搅拌反应。过滤除去沉淀, 溶液浓缩, 残余物添加 5 毫升异丙醇和 30 毫升乙醚, 过滤洗涤, 产物真空干燥, 得产物甲氧基聚乙二醇乙酸-N, N'-二叔丁氧酰-环常绿黄杨碱 D 酯(42)。产率: 0.456 克。NMR (DMSO): 0.37(s, 1 个氢), 0.52(s, 1 个氢), 0.79(t, 6 个氢), 3.5 (br m, PEG 中的氢), 1.38(s, 18 个氢)。

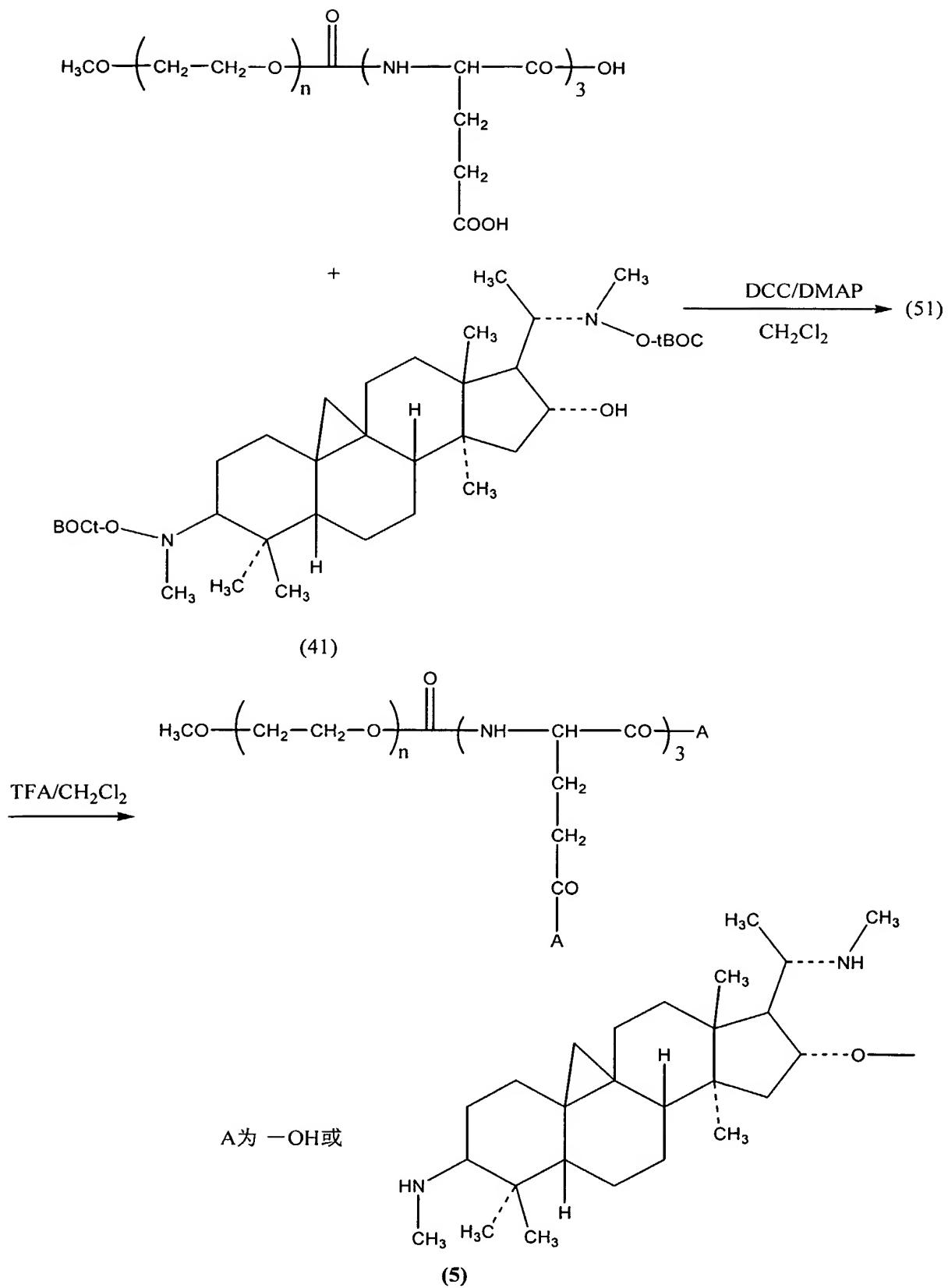
0.4 克甲氧基聚乙二醇乙酸-N, N'-二叔丁氧酰-环常绿黄杨碱 D 酯(42) (由上步制得) 溶解在 5 毫升氯仿中, 添加 1.5 毫升三氟乙酸 (TFA), 室温下搅拌 3 小时。溶液由无色变浅绿色, 减压浓缩溶液, 加入 20 毫升乙醚。过滤收集沉淀真空干燥, 得产物甲氧基聚乙二醇乙酸-环常绿黄杨碱 D 酯 (4)。产率: 0.365 克。NMR (DMSO): 0.37(s, 1 个氢), 0.52(s, 1 个氢), 0.79(t, 6 个氢), 3.5 (br m, PEG 中的氢)。

实施例 5

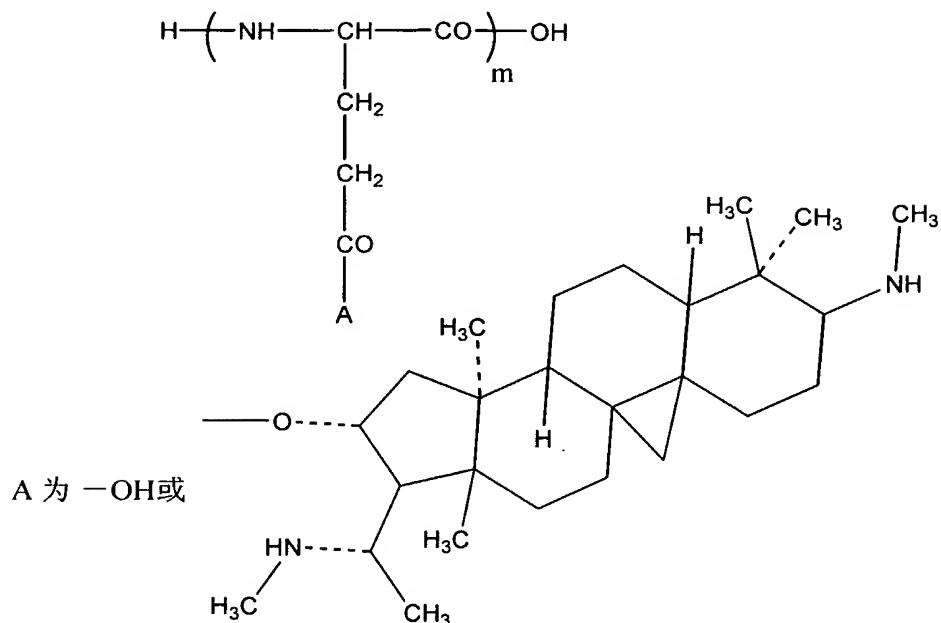
酯基键合的聚乙二醇多羧基寡肽和环常绿黄杨碱 D 的合成

1.0 克甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽 (Mw10800), 380 毫克 N, N'-二叔丁氧酰-环常绿黄杨碱 D (41), 18 毫克 4-二甲基氨基吡啶溶于 15 毫升无水二氯甲烷中, 再添加 30 毫克二环己基碳二亚胺。溶液室温过夜搅拌反应。过滤除去沉淀, 溶液浓缩, 残余物添加 5 毫升异丙醇和 30 毫升乙醚, 过滤洗涤, 产物真空干燥, 得产物甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽-N, N'-二叔丁氧酰-环常绿黄杨碱 D 酯(51)。产率: 0.456 克。

0.4 克甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽-N, N'-二叔丁氧酰-环常绿黄杨碱 D 酯(51) (由上步制得) 溶解在 5 毫升氯仿中, 添加 4 毫升三氟乙酸 (TFA), 室温下搅拌 1 小时。减压浓缩溶液, 加入 20 毫升乙醚。过滤收集沉淀真空干燥, 得产物甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽-环常绿黄杨碱 D 酯 (5)。产率: 0.365 克。



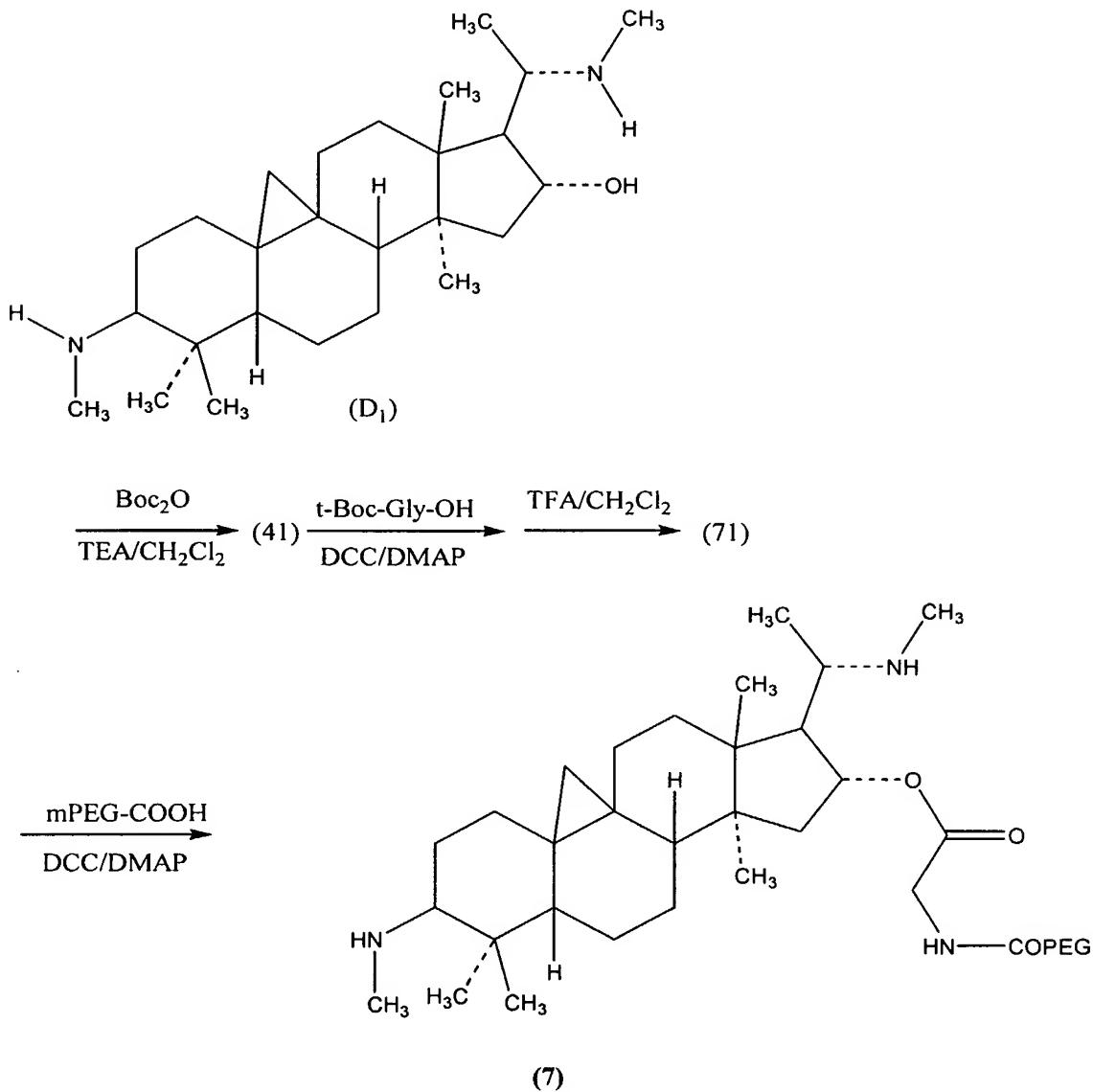
实施例 6
酯基键合的聚谷氨酸和环常绿黄杨碱 D 的合成



(6)

方法同实施例 5，将甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽换为聚谷氨酸(Mw5000)。得到聚谷氨酸-环常绿黄杨碱 D 酯 (6)，产率：0.9 克 (90%)。

实施例 7
酯基键合的聚乙二醇乙酸和环常绿黄杨碱 D 的合成



1.2 克 t-boc-甘氨酸 (t-Boc-Gly-OH), 3.0 克 N, N'-二叔丁氧酰-环常绿黄杨碱 D (41), 0.6 克 4-二甲基氨基吡啶溶于 30 毫升无水二氯甲烷中, 再添加 1.45 克二环己基碳二亚胺。溶液室温过夜搅拌反应。过滤除去沉淀, 有机相用 0.5M 的 pH5.7 的醋酸盐缓冲溶液洗涤 2 次, 再用无水硫酸钠干燥, 浓缩得白色片状固体。再加入 8 毫升二氯甲烷溶解, 加入 6 毫升三氟乙酸水解 30 分钟。减压浓缩, 加 20 毫升乙醚, 倾去上清液, 再加入 30 毫升乙醚超声振荡细化成白色粉末。过滤, 乙醚洗涤, 真空干燥, 得产物甘氨酸-环常绿黄杨碱 D 酯(71)。产率: 3.8 克。NMR (DMSO): 0.40(s,1 个氢),

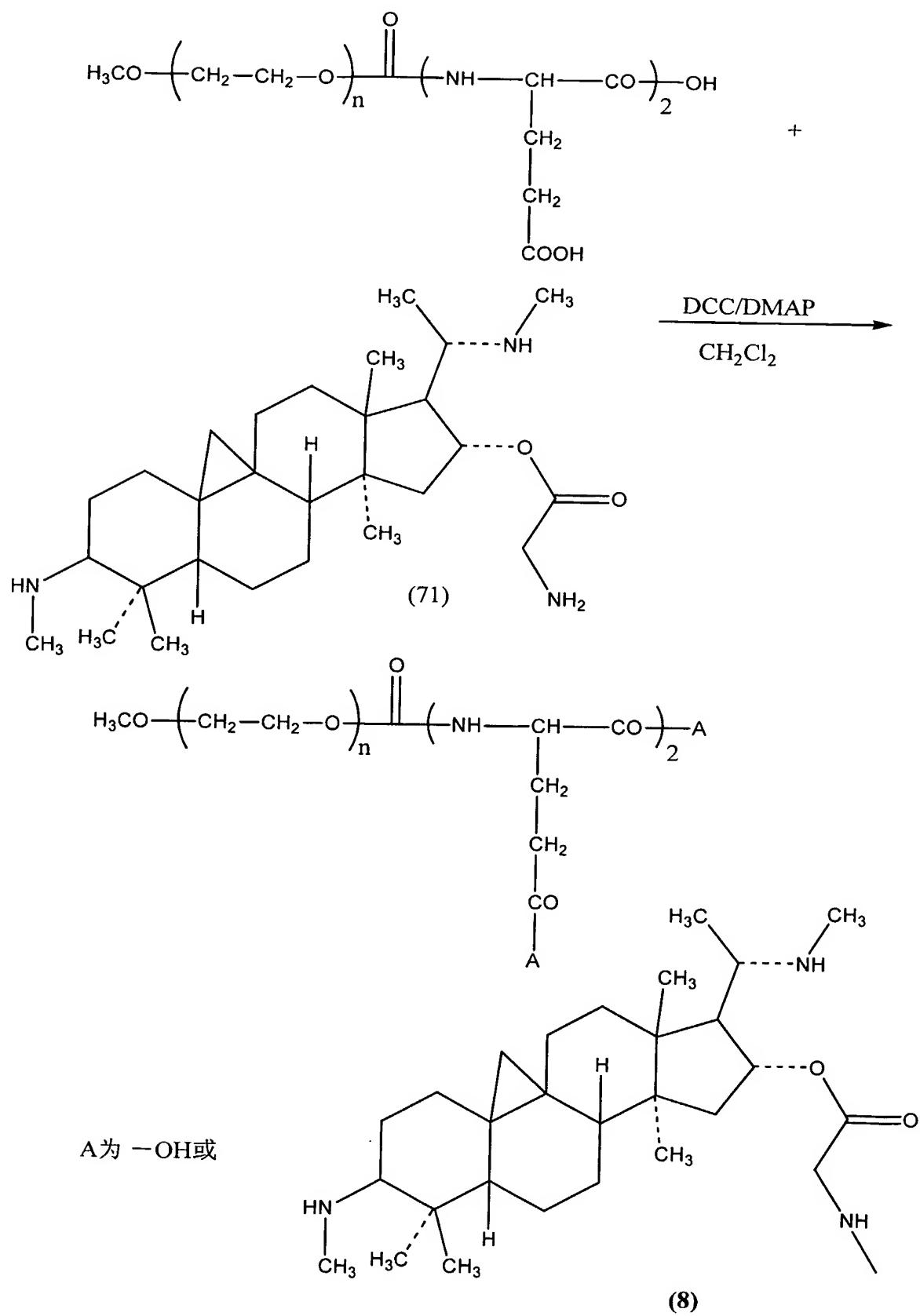
0.51(s,1 个氢), 4..96(t,1 个氢), 7.86 (s,1 个氢), 8.03(s,1 个氢), 8.35(s,3 个氢)。熔点: 149-152°C。

0.5 克甲氧基聚乙二醇乙酸 (Mw5000), 110 毫克甘氨酸-环常绿黄杨碱 D 酯(71) (由上步制得, Mw459), 25 毫克 4-二甲基氨基吡啶溶于 10 毫升无水二氯甲烷和 2 毫升二甲基甲酰胺混合溶液中, 再添加 42 毫克二环己基碳二亚胺。溶液室温过夜搅拌反应。过滤除去沉淀, 溶液浓缩, 残余物添加 5 毫升异丙醇和 30 毫升乙醚, 过滤洗涤, 产物真空干燥, 得产物甲氧基聚乙二醇乙酸-甘氨酰环常绿黄杨碱 D 酯 (7)。产率: 0.456 克。NMR (DMSO): 0.37(s,1 个氢), 0.52(s,1 个氢), 0.79(t,6 个氢), 3.5 (br m, PEG 中的氢)。

实施例 8

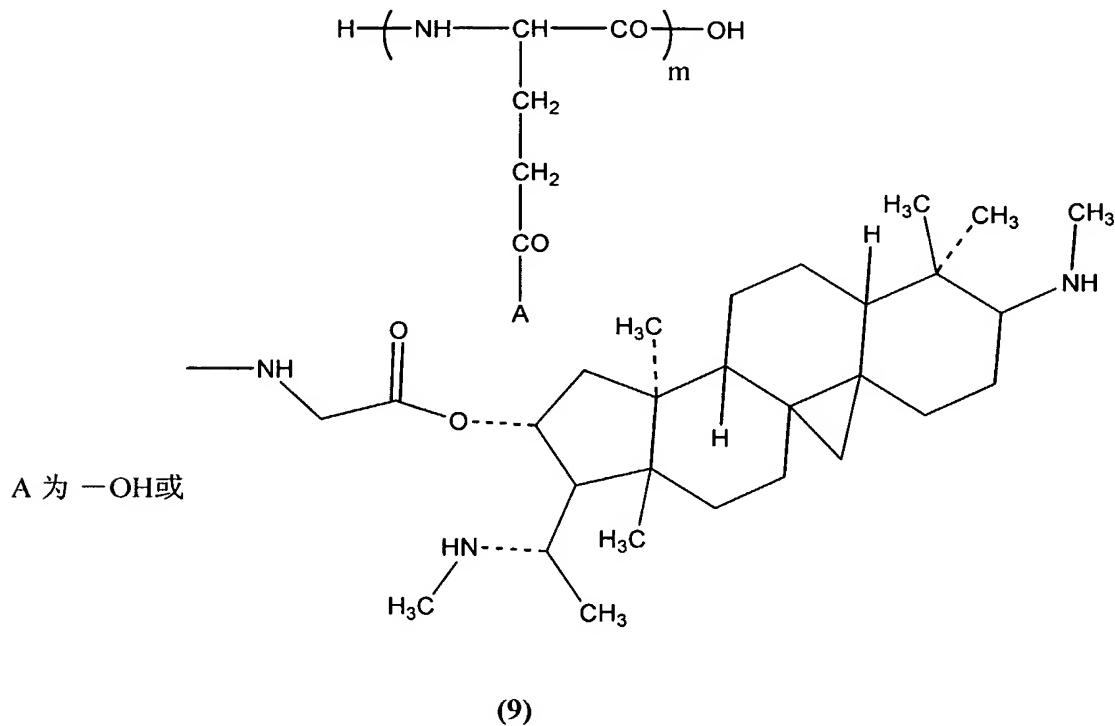
酯基键合的聚乙二醇多羧基寡肽和环常绿黄杨碱 D 的合成

1.0 克甲氧基聚乙二醇谷氨酸二肽 (Mw10800), 280 毫克甘氨酸-环常绿黄杨碱 D 酯(71), 50 毫克 4-二甲基氨基吡啶, 溶于 15 毫升无水二氯甲烷和 3 毫升二甲基甲酰胺混合溶液中, 再添加 120 毫克二环己基碳二亚胺。溶液室温过夜搅拌反应。过滤除去沉淀, 溶液浓缩, 残余物添加 30 毫升乙醚, 过滤洗涤, 产物真空干燥, 得产物甲氧基聚乙二醇谷氨酸二肽-甘氨酰环常绿黄杨碱 D 酯 (8)。产率: 1.16 克。NMR (DMSO): 0.37(s,2.7 个氢), 0.52(s,2.8 个氢), 4.89(s,2.6 个氢), 3.5 (br m, PEG 中的氢)。



实施例 9

方法同实施例 8, 将甲氧基聚乙二醇谷氨酸二肽换为甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽。得到甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽-甘氨酰环常绿黄杨碱 D 酯 (9), 产率: 0.9 克 (90%)。



实施例 10

方法同实施例 8，将甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽换为聚谷氨酸(Mw5000)。得到聚谷氨酸-甘氨酰环丙烯黄杨碱 D 酯 (9)，产率：0.9 克 (90%)。

实施例 11 药物组合物的制备

本实施例说明代表性非胃肠道给药的药物组合物的制备过程，所述组合物包含实施例 8 的结合物。

<u>成分</u>	<u>用量</u>
本发明的结合物	2 克
0.9% 盐水溶液	至 100 毫升

将本发明的结合物 2 克溶解于 0.9% 盐水溶液，得到 100 毫升的静脉注射用溶液，将其通过 0.2μm 的膜过滤材料过滤，在无菌条件下包装。

实施例 12
黄杨宁衍生物急毒与药效的实验(与原黄杨宁比较)

以下试验以实施例 8 所得到的产物(8)作为黄杨宁衍生物，以环常绿黄杨碱 D 的醋酸盐水溶液为注射液 (pH=5.7) 的化合物为原黄杨宁进行比较。

一. 急性毒性实验：

取健康昆明种小鼠，雌雄各半，体重 19-21g，随机分为五组。即 (1) 原黄杨宁制剂 I 组；(2) 黄杨宁衍生物制剂 II。试验前禁食(不禁水) 12 小时后，各组分别按上述剂量一次静脉给药以及腹腔注射给药 0.3ml/10g，观察 14 天内动物所发生的异常反应、死亡情况及死亡原因，未死亡动物于 14 后处死进行尸检。

结果：

1. 静脉注射 LD₅₀：原黄杨宁为 11.77mg/kg；黄杨宁衍生物为 35.50mg/kg；
2. 腹腔注射 LD₅₀：原黄杨宁为 97.52 mg/kg；黄杨宁衍生物为 144.98mg/kg。

二. 对抗垂体后叶素所致大鼠心肌缺血的影响：

取 SD 大鼠 50 只，雌雄各半，体重 180-220g，随机分组，即：模型组、原黄杨宁(环常绿黄杨碱 D) 小剂量组 (0.25mg/kg)、中剂量组 (0.5mg/kg)、黄杨宁衍生物(实施例 8 产物(8)) 小剂量组 (0.25mg/kg)、中剂量组 (0.5mg/kg)、5 个剂量组。实验前大鼠禁食不禁水 12 小时，腹腔注射乌拉坦 1g 生药/kg 麻醉，取仰卧位，针状电极小心刺入四肢皮下，测定 II 导联心电图，稳定 30min，并记录正常心电图。各组动物分别经尾静脉注射给药，10min 迅速经舌下静脉注射垂体后叶素 1.5u/kg，给垂体后叶素的时间不超过 10s，记录注射垂体后叶素后 15s、30s、1、2、3、5、7、10、15min 的心电图。

1. 对 T 波变化的影响：见表 1，表 2；
2. 对心率的影响：见表 3，表 4。

表 1：原黄杨宁对垂体后叶素致大鼠 T 波高抬的影响(X±S)

	模型组	中剂量组	小剂量组
0	0.18±0.049	0.21±0.052	0.20±0.040
15"	0.54±0.137	0.34±0.119**	0.50±0.092
30"	0.29±0.127	0.19±0.116	0.23±0.061
1'	0.25±0.054	0.23±0.068	0.22±0.08
2'	0.23±0.041	0.23±0.051	0.18±0.065
3'	0.24±0.046	0.23±0.047	0.21±0.072
5'	0.25±0.058	0.24±0.040	0.22±0.081
7'	0.23±0.050	0.25±0.048	0.21±0.076
10'	0.23±0.070	0.27±0.044	0.23±0.075
15'	0.24±0.064	0.26±0.040	0.24±0.081

与模型组比较, *P<0.05, **P<0.01

表 2：黄杨宁衍生物对垂体后叶素致大鼠 T 波高抬的影响(X±S)

	模型组	中剂量组	小剂量组
0	0.26±0.067	0.23±0.046	0.25±0.064
15"	0.40±0.088	0.33±0.123	0.24±0.059**
30"	0.24±0.16	0.22±0.107	0.17±0.123
1'	0.26±0.131	0.28±0.049	0.25±0.062
2'	0.27±0.076	0.27±0.029	0.22±0.102
3'	0.29±0.071	0.28±0.029	0.28±0.071
5'	0.32±0.059	0.31±0.059	0.33±0.056
7'	0.32±0.055	0.31±0.059	0.35±0.067
10'	0.31±0.059	0.30±0.065	0.32±0.052
15'	0.30±0.049	0.33±0.072	0.33±0.069

与模型组比较, *P<0.05, **P<0.01

结论：原黄杨宁中剂量组 (0.5mg/kg) 在 15 秒时能抑制垂体后叶素所致的 T 波高抬，与模型组比较有显著性

差异 (P<0.01)，黄杨宁衍生物小剂量组(0.25mg/kg)在 15 秒时即能抑制垂体后叶素也所致的 T 波高抬，与模型组比较有显著性差异 (P<0.01)。

表 3：原黃楊寧对垂体后叶素致大鼠心率的影响(X±S)

	模型组	中剂量组	小剂量组
0	417.4±29.35	389.6±46.56	392.4±48.11
15"	346.8±60.98	331.1±41.18	351.6±90.78
30"	175±62.25	234.5±85.06	202.9±42.85
1'	196.5±60.55	196.2±52.90	228.3±44.41
2'	238.5±53.76	215.4±45.47	250.3±29.14
3'	244.2±59.53	236.7±47.92	267.6±44.71
5'	251.1±46.99	256.6±51.26	266.4±30.09
7'	263±47.24	268.6±53.15	270.6±30.52
10'	275.4±51.80	260.8±93.87	289.8±43.91
15'	290.7±40.04	297.6±41.30	315.0±63.39

表 4：黃楊寧衍生物对垂体后叶素致大鼠心率的影响(X±S)

	模型组	中剂量组	小剂量组
0	400±89.44	420±60.00	420±60.00
15"	320±113.14	340±44.72	270±145.94
30"	200±89.44	260±107.70	200±128.06
1'	190±100.50	180±60.00	150±96.44
2'	240±69.28	200±56.57	180±60.00
3'	200±56.57	240±0.00	200±56.57
5'	220±44.72	260±44.72	240±69.28
7'	240±0.00	280±56.57	260±44.72
10'	260±44.72	280±56.57	260±44.72
15'	300±60.00	280±56.57	300±91.65

结果：原黃楊寧和黃楊寧衍生物对垂体后叶素致大鼠心率的无明显影响，与模型对照组比较 (P>0.05)。

结论：

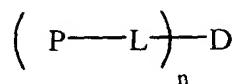
1. 原黃楊寧静脉注射急毒：LD50 为 11.77mg/kg，原黃楊寧腹腔注射急毒:LD50 为 97.52 mg/kg；黃楊寧衍生物静脉注射急毒：LD50 为 35.50mg/kg，黃楊寧衍生物腹腔注射急毒：LD50 为 144.98mg/kg，实验结果表明：两种途径给药的 LD50 值均高于原黃楊寧组，提示黃楊寧衍生物的毒性比原黃楊寧低。

2. 原黄杨宁中剂量组 (0.5mg/kg) 在 15 秒时能抑制垂体后叶素所致的 T 波高抬, 与模型组比较有显著性差异 (P<0.01), 而黄杨宁衍生物小剂量组(0.25mg/kg)在 15 秒时即能抑制垂体后叶素也所致的 T 波高抬, 与模型组比较有显著性差异 (P<0.01)。

3. 原黄杨宁和黄杨宁衍生物对垂体后叶素致大鼠心率的无明显影响, 与模型对照组比较无显著性差异 (P>0.05)。

权利要求

1、通式(I)表示的亲水性聚合物—黄杨木碱提取物或其衍生物的结合物：



(I)

其中：

P 为亲水性聚合物，选自由聚乙二醇、聚谷氨酸、聚天门冬氨酸、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚丙烯吗啉以及它们的共聚物所组成的组；

n 是一个整数，最大不超过 D 上的羟基和氨基总数；

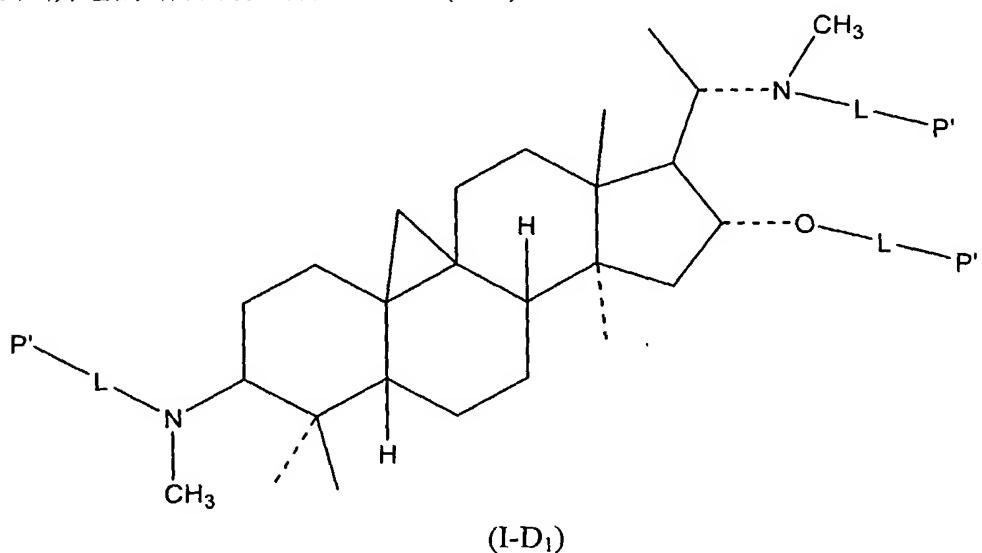
L 为连接基团，选自由酯基、碳酸酯基、酰胺基、酰胺酯基、醚基、氨基甲酸酯基和乙缩醛所组成的组；以及

D 为黄杨木碱提取物或其衍生物，选自由环常绿黄杨碱 D、环原黄杨碱 A、环原黄杨碱 C、环常绿黄杨碱 C 以及它们衍生物组成的组。

2、如权利要求 1 所述的结合物，其中，所述亲水性聚合物上的游离羟基可用 C₁₋₁₂ 烷氧基、环烷氧基或芳烷氧基取代。

3、如权利要求 1 所述的结合物，其中，所述的亲水性聚合物为聚乙二醇，其分子量在 300—60,000 之间。

4、一种权利要求 1 的结合物，其中，所述的黄杨木碱提取物或其衍生物为环常绿黄杨碱 D，所述的结合物具有如下通式(I-D₁)：



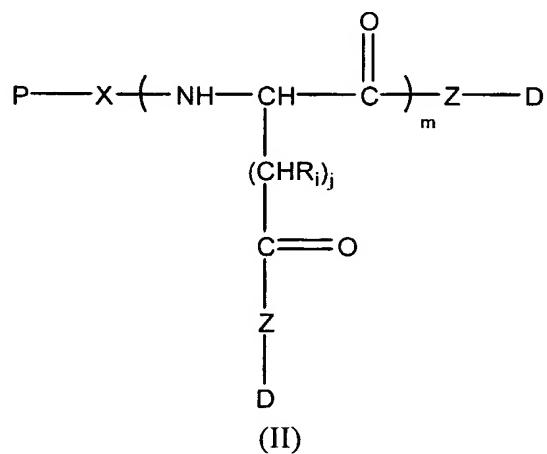
其中：

P' 代表 H 或 P ，但不同时为 H 。

5、如权利要求 1 所述的结合物，其中，所述的亲水性聚合物和所述的黄杨木碱提取物或其衍生物通过酯基连接。

6、如权利要求 1 所述的结合物，其中，所述的结合物选自 N,N'-二甲氧基聚乙二醇乙酸-环常绿黄杨碱 D 酰胺(1)；甲氧基聚乙二醇乙酸-环常绿黄杨碱 D 酯(4)；甲氧基聚乙二醇乙酸-甘氨酰环常绿黄杨碱 D 酯(7)组成的组。

7、通式(II)的亲水性聚食物—多羧基寡肽—黄杨木碱提取物或其衍生物结合物：



其中：

P是亲水性聚合物，选自由聚乙二醇、聚谷氨酸、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚丙烯吗啉以及它们的共聚物所组成的组；

m 是 2—12 的整数；

j 为 1-6 的整数;

R_i 为选自由 H、 C_{1-12} 烷基、取代芳基、芳烷基、杂烷基、和取代烷基组成的组的基团：

X 是连接基团, 选自由 $(CH_2)_k$ 、 $(CH_2)_kOCO$ 、 $(CH_2)_kNHCO$ 和 $(CH_2)_kCO$ 组成的组, 其中, k 是 0–10 的整数;

Z 是连接基团, 选自由 O、NH、NHR、O(CH₂)_hCOO 和 NH(CHR)_hCOO 组成的组, 其中, *h* 是 1—10 的整数:

D 为黄杨木碱提取物或其衍生物, 选自由环常绿黄杨碱 D、环原黄杨碱 A、环原黄杨碱 C、环常绿黄杨碱 C、以及它们的衍生物所组成的组。

8、如权利要求 7 所述的结合物，其中，所述的亲水性聚合物是聚乙二醇，其分子量在 300—60,000 之间。

9、如权利要求 7 所述的结合物，其中，所述的结合物选自甲氧基聚乙二醇谷氨酸二肽-环常绿黄杨碱 D 酰胺(2)；聚谷氨酸-环常绿黄杨碱 D 酰胺(3)；甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽-环常绿黄杨碱 D 酯(5)；聚谷氨酸-环常绿黄杨碱 D 酯(6)；甲氧基聚乙二醇谷氨酸三肽-甘氨酰环常绿黄杨碱 D 酯(8)；聚谷氨酸-甘氨酰环常绿黄杨碱 D 酯(9)所组成的组。

10、一种包含如权利要求 1-9 之一所述的结合物的药物组合物。

11、如权利要求 10 所述的药物组合物，其中，所述的药物组合物其为注射用剂、溶液剂、片剂、混悬剂或气雾剂。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/001259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C⁷ C07J 53/00, C08G 65/48, A61K 31/56, A61P 9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C⁷ C07J 53, C08G 65, C08F 283

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS, EPODOC, WPI, PAJ, CNKI, CA, STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1283643A 14. Feb. 2001 (14.02.2001)	1-11
A	CN1442440A 17. Sep. 2003 (17.09.2003)	1-11
A	CN1446838A 08. Oct. 2003 (08.10.2003)	1-11
A	CN1448420A 15. Oct. 2003 (15.10.2003)	1-11
A	CN1435429A 13. Aug. 2003 (13.08.2003)	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<ul style="list-style-type: none"> * Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 	<ul style="list-style-type: none"> “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
20.Jan. 2005 (20.01.2005)

Date of mailing of the international search report
24 · FEB 2005 (2.4 · 02 · 2005)

Name and mailing address of the ISA/
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

XUCHI

Telephone No. 86-10-62085562

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2004/001259

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
CN1442440A	2003-09-17	WO03074586A	2003-09-12
		AU2003221208A	2003-09-16

A. 主题的分类

Int. C⁷ C07J 53/00, C08G 65/48, A61K 31/56, A61P 9/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

Int. C⁷ C07J 53, C08G 65, C08F 283

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRS, EPODOC, WPI, PAJ, CNKI, CA, STN

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN1283643A 2001 年 2 月 14 日 (14.02.2001)	1-11
A	CN1442440A 2003 年 9 月 17 日 (17.09.2003)	1-11
A	CN1446838A 2003 年 10 月 8 日 (08.10.2003)	1-11
A	CN1448420A 2003 年 10 月 15 日 (15.10.2003)	1-11
A	CN1435429A 2003 年 8 月 13 日 (13.08.2003)	1-11

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期 20.1 月 2005 (20.01.2005)	国际检索报告邮寄日期 24 · 2 月 2005 (24 · 02 · 2005)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 徐赤 电话号码: (86-10)62085562

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/001259

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1442440A	2003-09-17	WO03074586A	2003-09-12
		AU2003221208A	2003-09-16